

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>C07K 14/16, G01N 33/569</b>		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 98/52969</b>
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 26. November 1998 (26.11.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/02816		(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, CN, CZ, HU, IL, JP, KR, MX, PL, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 13. Mai 1998 (13.05.98)			
(30) Prioritätsdaten: 197 20 914.9 16. Mai 1997 (16.05.97) DE		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; D-68298 Mannheim (DE).			
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): DONIE, Frederic [DE/DE]; In der Au 10, D-82377 Penzberg (DE). FAATZ, Elke [DE/DE]; Steinkreuz 1, D-82386 Huglfing (DE). HOESS, Eva [DE/DE]; Zitzelsbergerstrasse 13a, D-81476 München (DE).			
(74) Gemeinsamer Vertreter: BOEHRINGER MANNHEIM GMBH; Patentabteilung, D-68298 Mannheim (DE).			
(54) Title: <u>METHOD FOR DETECTING HIV ANTIBODIES AND ANTIGENS USED TO THIS END</u>			
(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON HIV-ANTIKÖRPERN UND DAZU VERWENDETE ANTIGENE			
(57) Abstract			
<p>The invention relates to a method for detecting HIV antibodies using an immunoassay. Said method is characterized in that at least one antigen of the env- gene product gp41 of an HIV1-subtype D-isolate and at least one antigen derived from the gp41 of a different HIV1-subtype of group M are used and/or that at least one antigen of the gp41 of an HIV1-subtype E-isolate and at least one antigen derived from the gp41 of a different HIV1-subtype of group M, are used. The invention also relates to antigens and antigen mixtures whose constituents are derived from the gp41 of an HIV1-subtype D-isolate or from the gp41 of the HIV-subtype E-isolate, as well as to their use for detecting HIV antibodies, and to a reagent kit.</p>			
(57) Zusammenfassung			
<p>Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Antikörpern gegen HIV mittels eines Immunoassays, das dadurch gekennzeichnet ist, daß mindestens ein Antigen des env-Genproduktes gp41 eines HIV1-Subtyp D-Isolats und mindestens ein Antigen, das von gp41 eines anderen HIV1-Subtyps der Gruppe M abgeleitet ist, verwendet wird und/oder mindestens ein Antigen von gp41 eines HIV1-Subtyp E-Isolats und mindestens ein Antigen, das von gp41 eines anderen HIV1-Subtyps der Gruppe M abgeleitet ist, verwendet wird. Weiterhin betrifft die Erfindung Antigene und Antigengemische, deren Bestandteile von gp41 eines HIV1-Subtyp D-Isolats bzw. von gp41 des HIV1-Subtyp E-Isolats abgeleitet sind, sowie deren Verwendung zum Nachweis von HIV-Antikörpern und ein Reagenzienkit.</p>			

# LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften. Die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

**Verfahren zum Nachweis von HIV-Antikörpern und dazu verwendete Antigene**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Antikörpern gegen HIV mittels eines Immunoassays, das dadurch gekennzeichnet ist, daß mindestens ein Antigen abgeleitet von gp41 eines HIV1-Subtyp D-Isolats, insbesondere aus dem Epitopbereich von Aminosäure (AS) 518-533 der Consensus D-Sequenz (= Epitopbereich II) und mindestens ein Antigen, das aus dem entsprechenden Bereich von gp41 eines anderen HIV1-Subtyp-Isolats der Gruppe M abgeleitet ist, verwendet wird und/oder mindestens ein Antigen abgeleitet von gp41 eines HIV1-Subtyp E-Isolats, insbesondere aus dem Epitopbereich von AS 551-565 der Consensus E-Sequenz (= Epitopbereich I) und mindestens ein Antigen, das aus dem entsprechenden Bereich von gp41 eines anderen HIV1-Subtyps der Gruppe M abgeleitet ist, verwendet wird. Weiterhin betrifft die Erfindung Antigene und Antigengemische, deren Bestandteile vom env-Genprodukt gp41 des HIV1 Subtyps D bzw. von gp41 des HIV1 Subtyp E abgeleitet sind, sowie deren Verwendung zum Nachweis von HIV-Antikörpern und ein Reagenzienkit.

AIDS (acquired immunodeficiency syndrome) ist eine erworbene Immunschwäche-Krankheit, die durch das HIV-Virus verursacht wird. Bisher sind als Erreger die Stämme HIV1 und HIV2 bekannt. Beide Stämme ähneln sich in Bezug auf Morphologie, Zelltropismus, Wechselwirkung mit dem CD4-Rezeptor von T-Zellen, den in vitro cytopathischen Effekt auf CD4-Zellen, die generelle genomische Struktur und die Fähigkeit, die Krankheit AIDS auszulösen (Clavel, 1987, AIDS 1, 135-140). Allerdings ist der immunologische Verwandtschaftsgrad gering, so daß HIV1-spezifische Antikörper im allgemeinen keine Kreuzreaktion zu HIV2 zeigen. Neben den am weitesten verbreiteten HIV1 Gruppe M Subtypen ist noch ein weiterer HIV1-Subtyp, der Subtyp O bekannt (Myers et al, Los Alamos Datenbank, 1994; Sharp et al. AIDS Suppl. 8, S27-S42, 1994). Vorherrschend sind jedoch Infektionen mit HIV1 Gruppe M.

Die einzelnen HIV-Subtypen der Gruppe M weisen trotz der grundsätzlichen Verwandtschaft untereinander in einigen genomischen Bereichen erhebliche Sequenzunterschiede auf, die dazu führen, daß auch auf Proteinebene zum Teil Heterogenitäten existieren. So kann es beispielsweise vorkommen, daß ein HIV-Antikörper-Nachweis, in dem Testbestandteile bzw. Antigene vorhanden sind, die spezifisch mit HIV1-Subtyp A reagieren, nicht mit HIV1-Subtyp B-Proben reagiert. Dies führt zu falsch negativen Testergebnissen, die im Interesse des Patienten auf jeden Fall vermieden werden sollten.

Die Verwendung von Peptiden, die aus dem env-Bereich von HIV abgeleitet sind, zum Nachweis von Antikörpern gegen HIV, ist im Stand der Technik bekannt. So werden in der EP-A-0 326 490 synthetische Peptide zum Nachweis von HIV-Antikörpern beschrieben, die aus dem gp41-Bereich von HIV1 bzw. dem gp36-Bereich von HIV2 (dort gp42 genannt) abgeleitet sind. Eine lückenlose Bestimmung von Antikörpern gegen verschiedene HIV1-Subtypen, insbesondere der vorherrschenden Gruppe M, ist mit diesen Peptiden nicht möglich.

---

In der WO 95/33206 wird ein immunologisches Verfahren zum simultanen Nachweis von Antikörpern gegen gp41, gp36 und gag-p24 offenbart. Das Verfahren funktioniert nach dem Prinzip des Brückentests, wie es beispielsweise in der EP-A-0 280 211 beschrieben ist, bei dem zwei Antigene den nachzuweisenden Antikörper verbrücken. Eines der Antigene ist an eine Festphase gebunden. Der Nachweis des verbrückenden Antikörpers erfolgt über die Markierung, die das andere Antigen trägt. In dem in der WO 95/33206 offenbarten Verfahren werden als Antigene Peptide verwendet, die von gp41 (HIV1) bzw. gp36 (HIV2) und vom HIV1 gag-p24 abgeleitet sind. Die offenbarten Peptidsequenzen für gp41 sind von den HIV1-Subtypen O und B abgeleitet. Eine weitergehende Bestimmung von Subtypen, die gewährleistet, daß auch andere HIV-Subtypen der Gruppe M sicher und mit ausreichender Sensitivität detektiert werden, ist mit diesem Verfahren nicht möglich.

Das Problem, daß aufgrund der serologischen Heterogenität innerhalb der HIV1 Gruppe M mit den bislang bekannten, kommerziell erhältlichen Tests falsch negative Resultate erzielt werden, wird von Apetrei et al (AIDS 1996, Vol. 10, S. F57-F60) beschrieben. Es wird

gezeigt, daß die derzeit erhältlichen Screening-Tests zur Diagnose einer HIV-Detektion zwar den HIV1-Subtyp B erfassen. Jedoch werden Non-B-Subtypen wie beispielsweise Subtyp A, E oder G nicht oder nur schwach positiv detektiert. Die aus dem Stand der Technik bekannten immunologischen Nachweisverfahren weisen somit erhebliche Schwächen auf.

In der französischen Patentanmeldung FR-A1-2 730 493 werden Polypeptide der Glykoproteine gp120 und gp41 beschrieben, die vom HIV1-Stamm MAD abgeleitet sind. Der HIV1-Stamm MAD ist vermutlich dem Gruppe-M-Subtyp D zuzuordnen. In dieser Anmeldung wird zwar darauf hingewiesen, daß falsch-negative Nachweisreaktionen bei der Detektion von HIV-Infektionen infolge der hohen Variabilität von HIV ein Problem darstellen. Ein Lösungsansatz für dieses Problem wird jedoch nicht offenbart.

Aufgabe war es daher, ein verbessertes Verfahren zum Nachweis von Antikörpern gegen HIV und insbesondere HIV1-Subtypen zur Verfügung zu stellen. Dieses verbesserte Verfahren sollte gewährleisten, daß insbesondere die Subtypen der weit verbreiteten Gruppe M spezifisch und eindeutig nachgewiesen werden.

---

Die Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zum Nachweis von Antikörpern gegen HIV mittels eines Immunoassays, das dadurch gekennzeichnet ist, daß

- a) mindestens ein Antigen abgeleitet von gp41 eines HIV1-Subtyp D-Isolats, bevorzugt abgeleitet aus dem Epitopbereich II = AS 518-533 der Consensus D-Sequenz, und mindestens ein Antigen, das aus dem entsprechenden Bereich von gp41 eines anderen HIV1-Subtyp-Isolats der Gruppe M abgeleitet ist, verwendet wird und/oder
- b) mindestens ein Antigen von gp41 eines HIV1-Subtyp E-Isolats, bevorzugt abgeleitet aus dem Epitopbereich I = AS 551-565 der Consensus E-Sequenz, und mindestens ein Antigen, das aus dem entsprechenden Bereich von gp41 eines anderen HIV1-Subtyps der Gruppe M abgeleitet ist, verwendet wird. Durch das erfindungsgemäße Verfahren werden die Nachteile des Standes der Technik zum großen Teil überwunden, das heißt, daß mit dem erfindungsgemäßen Verfahren Proben von Patienten sicherer erfaßt werden, die mit HIV1-Subtypen der Gruppe M infiziert sind.

Es hat sich überraschenderweise herausgestellt, daß durch den Einsatz von Antigenen, die vom env-Genprodukt gp41 und insbesondere von Sequenzen der Epitopbereiche I und II von gp41 der verschiedenen HIV1-Subtypen stammen, der zuverlässigere Nachweis von HIV-Infektionen mit den Subtypen der Gruppe M und Subtyp O ermöglicht wird. Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren, bei dem mindestens ein Antigen, das von gp41 eines Subtyp D-Isolats (Epitopbereich II = AS 518-533 der Consensus D-Sequenz) abgeleitet ist, und/oder mindestens ein Antigen, das von gp41 eines HIV 1 Subtyp E-Isolats (Epitopbereich I = AS 551-565 der Consensus E-Sequenz) abgeleitet ist, eingesetzt wird, wird gewährleistet, daß Proben, die Antikörper gegen Proteine von Gruppe M-Subtypen enthalten, sicherer als bisher nachgewiesen werden. Auch bei niedriger Antikörperkonzentration in der Probe wird eine gute Erkennung von verschiedenen HIV-Subtypen im Test ermöglicht. Die Gefahr falsch negativer Diagnosen wird durch das erfindungsgemäße Verfahren entscheidend verringert.

Bevorzugt werden im erfindungsgemäßen Verfahren die Antigene als Gemisch verschiedener Antigene eingesetzt. Dadurch kann in Proben mit hoher Antikörperkonzentration die Gefahr des Hook-Effekts verringert werden, da in der Mischung in der Regel einige Antigene mit hoher Affinität und einige mit schwächerer Affinität vorliegen. Durch das erfindungsgemäße Verfahren wird außerdem der Einsatz von definierten Antigensequenzen ermöglicht.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann in allen dem Fachmann geläufigen Testführungen zum immunologischen Nachweis von HIV-Infektionen und insbesondere zum Nachweis von HIV-Antikörpern zur Anwendung kommen. Dazu gehören beispielsweise homogene und heterogene Immunoassays. Bei homogener Testführung erfolgt nach der Reaktion, d.h. der Bindung von Antikörper und Analyt keine Trennung von fester und flüssiger Phase. Vielmehr erfolgt der Nachweis des Analyten bei homogenen Testführungen häufig anhand der eintretenden Trübung, die auftritt, wenn durch die Anwesenheit des Analyten eine Vernetzung von Antikörpern und Antigenen erzeugt wird. Diese Verfahren mit Trübungsmessung werden auch als turbidimetrische Verfahren bezeichnet. Im erfindungsgemäßen Verfahren können beispielsweise die Antigene als multimere Antigene

(sogenannte Polyhaptene) vorliegen, die dann durch die in der Probe vorhandenen Antikörper proportional zu deren Konzentration vernetzt werden.

Bevorzugt sind jedoch heterogene Testführungen. Verfahren nach dem Brückentest-Konzept und dem Sandwich-Prinzip zählen beispielsweise zu den heterogenen Verfahren. Beim Brückentest verbrückt der nachzuweisende Antikörper ein festphasengebundenes Antigen mit einem markierten Antigen. Nach erfolgter immunologischer Reaktion wird die feste von der flüssigen Phase getrennt und die Markierung in einer der beiden Phasen bestimmt. Die Höhe des Signals ist ein Maß für die Menge bzw. Konzentration des Analyten (hier des Antikörpers).

Beim Sandwich-Prinzip fängt ein festphasengebundener Antikörper den Analyten ein. Ein zweiter markierter Antikörper bindet ebenfalls an den Analyten. Die Trennung von fester und flüssiger Phase und der Nachweis der Markierung erfolgt analog zum Brückentest-Verfahren. Die beschriebenen Testführungen sollen die erfindungsgemäß möglichen immunologischen Nachweisverfahren nicht einschränken, sondern vielmehr anschaulich erläutern. Besonders bevorzugt wird das erfindungsgemäße Verfahren nach dem Brückentest-Konzept durchgeführt. Ebenfalls besonders bevorzugt sind auch kombinierte Nachweisverfahren, sogenannte „Kombitests“, bei denen der Brückentest für den Nachweis von spezifischen Antikörpern und das Sandwich-Verfahren zum Nachweis von spezifischen Antigenen simultan verwendet wird. Im vorliegenden Fall können mit Hilfe der erfindungsgemäßen Antigene und Antigengemische spezifische HIV-Antikörper nachgewiesen werden. Gleichzeitig können durch den Einsatz von Antikörpern, die für ein oder mehrere HIV-Antigene spezifisch sind, durch das Sandwich-Verfahren HIV-Antigene detektiert werden.

In der deutschen Patentanmeldung DE 197 09 762.6 wird ein Kombitest beschrieben, mit Hilfe dessen der simultane Nachweis von HIV-Antigenen und Antikörpern ermöglicht wird. Im Rahmen eines solchen Kombitests wird das erfindungsgemäße Nachweisverfahren bevorzugt eingesetzt.

Gegenstand der Patentanmeldung DE 197 09 762.6 ist ein immunologisches, bevorzugt heterogenes Verfahren zum Nachweis einer HIV-Infektion, bei dem die Rezeptoren R1 bis R6 verwendet werden. In diesem Verfahren werden als Rezeptoren R1 und R2 solche eingesetzt, die das zu bestimmende HIV1-p24- und/oder HIV2-p26-Antigen spezifisch binden. Als Rezeptoren R3 und R4 werden ein oder mehrere Antigene aus dem env-Bereich von HIV1, HIV2 oder HIV1-SubO verwendet (gp160, gp120, gp41 für HIV1/HIV1-SubO und gp140, gp110, gp36 für HIV2). Bevorzugt werden als Rezeptoren R3 und R4 gp41 und/oder gp36 oder Fragmente davon verwendet. Als Rezeptoren R5 und R6 werden ein oder mehrere Antigene aus dem pol- oder gag-Bereich von HIV1, HIV2, oder HIV1-SubO verwendet, wobei dies nicht p24 oder p26 sein darf. Bevorzugt werden als R5 und R6 Antigene aus dem pol-Bereich von HIV1, HIV2, oder HIV1-SubO eingesetzt. Besonders bevorzugt wird als Rezeptor R5 und R6 die Reverse Transkriptase (RT) verwendet. Die in der vorliegenden Anmeldung in einem späteren Abschnitt genauer beschriebenen Antigene und Antigengemische werden bevorzugt in einem solchen Kombitest als Rezeptoren R3 und R4 eingesetzt.

---

Die in der deutschen Patentanmeldung DE 197 09 762.6 beschriebenen Testführungen,

sowie die Möglichkeiten der Festphasenbindung bei heterogener Testführung, die Verfahren zum Nachweis der Markierung etc. sind ebenfalls Bestandteil der vorliegenden Anmeldung und werden daher hier im einzelnen nicht nochmals gesondert aufgeführt.

Das erfindungsgemäße Verfahren der vorliegenden Anmeldung kann als Naß- und als Trockentest durchgeführt werden. Bei den Naßtesten liegen alle Testreagenzien in flüssiger Phase vor. Es können jedoch auch alle gängigen Trockentestformate, die zum Nachweis von Proteinen bzw. Antikörpern geeignet sind, verwendet werden. Bei diesen Trockentests oder Teststreifen, wie sie beispielsweise in der EP-A-0 186 799 beschrieben sind, sind die Testkomponenten auf einem Träger aufgebracht. Bevorzugt wird das erfindungsgemäße Verfahren jedoch als Naßtest durchgeführt.

Als Proben, die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren analysiert werden, können alle dem Fachmann bekannten biologischen Flüssigkeiten, die vermutlich mit HIV infiziert sind,



verwendet werden. Bevorzugt werden als Probe Körperflüssigkeiten wie Vollblut, Blutserum, Blutplasma, Urin, Speichel etc. eingesetzt.

Die im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzten Antigene sind vom env-Genprodukt gp41 von HIV1 abgeleitet. Die Antigene, deren Sequenzen in den SEQ ID NO 1 bis 7 beschrieben sind, und die bevorzugt im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden, stammen von den sogenannten Epitopbereichen I und/ oder II von gp41 für die verschiedenen HIV1-Subtypen ab. Ein Teil der Peptide läßt sich zum Epitopbereich II, der andere Teil zum Epitopbereich I von gp41 zuordnen. Diese Bereiche sind immunologisch besonders reaktiv. Ein Vergleich der Sequenzen in diesen Bereichen zeigt, daß hier bei den verschiedenen HIV1-Subtypen Heterogenitäten auftreten. Es hat sich außerdem gezeigt, daß insbesondere beim Subtyp D (Epitopbereich II) größere Sequenzheterogenitäten als bei den übrigen Vertretern der Gruppe M auftreten.

Tabelle 1 zeigt die Sequenzvarianten verschiedener HIV1-Subtypen im Epitopbereich II von gp41. Tabelle 2 zeigt die Sequenzvarianten verschiedener HIV1-Subtypen im Epitopbereich I von gp41. Die Zahlen unter den Sequenzen geben die jeweiligen Aminosäurepositionen im gp41 an.

---

**Tabelle 1: Sequenzvarianten aus dem gp41 Epitopbereich II von HIV1**

Subtyp A	L	G	I	W	G	C	S	G	K	L	I	C	T	T	t	V
															n	
	531															546
Subtyp B	L	G	I	W	G	C	S	G	K	L	I	C	T	T	a	V
															t	
	547															562
Subtyp C	L	G	I	W	G	C	S	G	K	L	I	C	T	T	a	V
															t	
															n	
	524															539
Subtyp D	L	G	I	W	G	C	S	G	k	H	I	C	T	T	i	V
									r						t	
															n	
	518															533
Subtyp E	L	G	L	W	G	C	S	G	K	I	I	C	T	T	A	V
	562															577
Subtyp F	L	G	L	W	G	C	S	G	K	L	I	C	T	T	N	V
	531															546
Subtyp G	L	G	I	W	G	C	S	G	K	L	I	C	T	T	N	V
	534															549
Subtyp O (Ant 70-Isolat)	L	S	L	W	G	C	K	G	K	L	V	C	Y	T	S	V
	581															596

**Tabelle 2: Sequenzvarianten aus dem gp41 Epitopbereich I von HIV1**

Subtyp A	A	v	E	r	Y	L	r	D	Q	Q	L	L	G	I	W
		l		s			k								
	520														534
Subtyp B	A	V	E	R	Y	L	k	D	Q	Q	L	L	G	I	W
							r								
	536														550
Subtyp C	A	I	E	R	Y	L	K	D	Q	Q	L	L	G	I	W
	513														527

Subtyp D	A	V	E	r	Y	L	k	D	Q	Q	L	L	G	I	W
				s			r								
	507														521
Subtyp E	A	V	E	R	Y	L	K	D	Q	K	F	L	G	L	W
	551														565
Subtyp F	A	V	E	R	Y	L	k	D	Q	Q	L	L	G	L	W
							q								
	520														534
Subtyp G	A	V	E	R	Y	L	k	D	Q	Q	L	L	G	I	W
							q								
							r								
	523														537
Subtyp O (Ant 70-Isolat)	A	L	E	T	L	L	Q	N	Q	Q	L	L	S	L	W
	570														584

Die Positionen, die durch mehrere Aminosäuren besetzt werden können und somit zur Heterogenität der Subtypen beitragen, sind mit dem einbuchstabigen Aminosäure-Code in Kleinbuchstaben versehen.

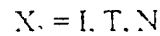
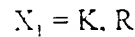
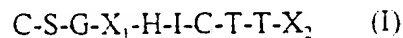
Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Antigene, die vom Epitopbereich II von gp41 des HIV1-Subtyps D abgeleitet sind. Die Antigene entsprechen bevorzugt den Sequenzen aus Tabelle 3 oder Teilsequenzen daraus und sind im Sequenzprotokoll unter der Bezeichnung SEQ ID NO 1 bis 6 beschrieben.

**Tabelle 3: Antigene aus dem Epitopbereich II aus gp41 von HIV1-Subtyp D**

	SEQ ID NO														
Subtyp D	1	L	G	I	W	G	C	S	G	K	H	I	C	T	T I V
	2	L	G	I	W	G	C	S	G	R	H	I	C	T	T T V
	3	L	G	I	W	G	C	S	G	K	H	I	C	T	T N V
	4	L	G	I	W	G	C	S	G	R	H	I	C	T	T I V
	5	L	G	I	W	G	C	S	G	R	H	I	C	T	T N V
	6	L	G	I	W	G	C	S	G	K	H	I	C	T	T T V

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Antigene, die Teilsequenzen der in Tabelle 3 offenbarten Sequenzen SEQ ID NO 1-6 mit einer Mindestlänge von 7 Aminosäuren enthalten, wobei der Bereich die sich zwischen den beiden Cysteinen befinden

Aminosäuren einschließlich der beiden Cysteine umfaßt. Die beiden Cysteine liegen zumeist in Form einer intramolekularen Disulfidbrücke vor, wodurch eine geschlossene ringförmige Struktur, also ein Loop entsteht. Besonders bevorzugt sind jedoch Antigene, die Teilsequenzen der in Tabelle 3 offenbarten Sequenzen SEQ ID NO 1-6 mit einer Mindestlänge von 10 Aminosäuren enthalten, wobei der Bereich mindestens die sich zwischen den beiden Cysteinen befindenen Aminosäuren einschließlich der beiden Cysteine und drei sich C-terminal anschließenden Aminosäuren umfaßt. Besonders bevorzugte Teilsequenzen entsprechen der in Formel (I) angegebenen Struktur:



Wenn  $\text{X}_1 = \text{K}$  ist, darf jedoch  $\text{X}_2$  nicht T sein.

Aus Formel (I) ergeben sich folgende bevorzugte Sequenzen SEQ ID NO 7-11, die bevorzugten Teilsequenzen der SEQ ID NO 1-6 entsprechen:

SEQ ID NO 7:	C-S-G-K-H-I-C-T-T-I	(I)
SEQ ID NO 8:	C-S-G-K-H-I-C-T-T-N	(I)
SEQ ID NO 9:	C-S-G-R-H-I-C-T-T-I	(I)
SEQ ID NO 10:	C-S-G-R-H-I-C-T-T-N	(I)
SEQ ID NO 11:	C-S-G-R-H-I-C-T-T-T	(I)

Diese Sequenzen können von weiteren Aminosäuren flankiert oder nach dem Fachmann geläufigen Methoden modifiziert sein. Die einzige Bedingung, die erfüllt sein muß, ist die, daß das modifizierte Antigen von Antikörpern, die gegen die unmodifizierte Teilsequenz gerichtet sind, erkannt und spezifisch gebunden wird.

Ebenfalls ein Gegenstand der Erfindung sind Antigene, die vom Epitopbereich I von gp41P1 des HIV1-Subtyps E abgeleitet sind. Die Antigene enthalten bevorzugt die Sequenz aus Tabelle 4 oder Teilsequenzen daraus mit einer Mindestlänge von 6 Aminosäuren und sind im Sequenzprotokoll unter der Bezeichnung SEQ ID NO 12 beschrieben.

**Tabelle 4: Antigene aus dem P1-Bereich aus gp41 von HIV1-Subtyp E**

SEQ ID NO	
Subtyp E	12      A   V   E   R   Y   L   K   D   Q   K   F   L   G   L   W

Mit Hilfe dieser Antigene aus dem Epitopbereich I bzw. II von HIV1-gp41 gemäß SEQ ID NO 1 bis 12 ist eine erheblich verbesserte Erkennung von Non-B-Subtypen beim Nachweis von HIV-Antikörpern möglich.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist daher die Verwendung eines Antigens gemäß SEQ ID NO 1 bis 11 oder Teilsequenzen davon und/oder eines Antigens gemäß SEQ ID NO 12 oder Teilsequenzen davon zum Nachweis von Antikörpern gegen HIV, insbesondere von Antikörpern gegen HIV1-Subtypen der Gruppe M.

Als besonders vorteilhaft zur zuverlässigen Detektion verschiedener HIV1-Subtypen hat sich die Verwendung von Antigengemischen herausgestellt. Dabei ist es günstig, wenn mindestens zwei verschiedene Antigene, die auf der Sequenz unterschiedlicher Subtypen basieren, im Nachweisverfahren eingesetzt werden. Gegenstand der Erfindung ist daher auch ein Antigengemisch, bestehend aus mindestens zwei Antigenen, wobei mindestens ein Antigen von gp41 eines HIV1-Subtyp D und mindestens ein Antigen aus der entsprechenden Region von gp41 eines anderen HIV1-Subtyps der Gruppe M abgeleitet ist. Bevorzugt entspricht das Antigen von gp41 eines HIV1-Subtyp D-Isolats dem Epitopbereich II (AS 518-533) der Consensus D-Sequenz, wobei besonders bevorzugt ein Antigen gemäß SEQ ID NO 1-11 verwendet wird.

Ebenfalls ein Gegenstand der Erfindung ist ein Antigengemisch, bestehend aus mindestens einem Antigen abgeleitet von gp41 eines HIV1-SubtypE-Isolats und mindestens einem Antigen, das aus dem entsprechenden Bereich von gp41 eines anderen HIV1-Subtyps der Gruppe M abgeleitet ist. Bevorzugt entspricht das Antigen von gp41 eines HIV1-Subtyp E-Isolats dem Epitopbereich I (AS 551-565) der Consensus E-Sequenz, wobei besonders bevorzugt ein Antigen gemäß SEQ ID NO 12 verwendet wird.

Das Antigengemisch kann erfindungsgemäß auch aus Antigenen der Epitopbereiche II und I von gp41 bestehen. Das Gemisch besteht dann aus mindestens einem Antigen abgeleitet von gp41 eines HIV1-Subtyp D-Isolats, wobei bevorzugt ein Antigen aus dem Epitopbereich II (AS 518-533) der Consensus D-Sequenz und besonders bevorzugt ein Antigen gemäß den SEQ ID NO 1-11 eingesetzt wird, mindestens einem Antigen aus dem entsprechenden Bereich von gp41 eines anderen HIV1-Subtyps der Gruppe M, mindestens einem Antigen von gp41 eines HIV1-Subtyp E-Isolats, wobei bevorzugt ein Antigen aus dem Epitopbereich I (AS 551-565) der Consensus E-Sequenz und besonders bevorzugt ein von SEQ ID NO 12 abgeleitetes Antigen eingesetzt wird und mindestens einem Antigen, das aus dem entsprechenden Bereich von gp41 eines anderen HIV1-Subtyps der Gruppe M abgeleitet ist, bestehen. Mit einem solchen Gemisch wird ein großes Maß an experimenteller Sicherheit bei der Erkennung und dem Nachweis von Antikörpern gegen verschiedene HIV1-Subtypen im gp41-Bereich erreicht. Dabei reicht es jedoch aus, wenn nur von einem Epitopbereich die komplette Mischung vorliegt (z.B. Epitopbereich II von Subtyp D und einem anderen Vertreter der Gruppe M) und von dem zweiten Epitopbereich nur noch eine zusätzliche Sequenz (z.B. ein Antigen aus dem Epitopbereich I nur eines Gruppe M-Vertreter) beige-steuert wird.

---

Bevorzugt werden solche Antigengemische eingesetzt, bei denen das Antigen aus dem Epitopbereich II von gp41 eines HIV1-Subtyp D-Isolats der SEQ ID NO 1 bis 6 oder Teilsequenzen davon mit einer Mindestlänge von 7 AS oder SEQ ID NO 7 bis 11 entspricht, und/oder das Antigen aus dem Epitopbereich I von gp41 eines HIV1-Subtyp E-Isolats der SEQ ID NO 12 oder Teilsequenzen davon mit einer Mindestlänge von 6 AS entspricht.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist daher auch die Verwendung eines der weiter oben beschriebenen Antigengemische zum Nachweis von Antikörpern gegen HIV, insbesondere von Antikörpern gegen HIV1-Subtypen der Gruppe M und Subtyp O. Für den gleichzeitigen Nachweis von Subtyp O ist gegebenenfalls der Einsatz von einem oder

mehreren Subtyp O-spezifischen Antigenen aus den Epitopbereichen I oder II von gp41 notwendig.

Besonders bevorzugt wird zu den oben beschriebenen Antigengemischen ein zusätzliches Antigen, das aus dem Epitopbereich II von gp41 des HIV1-Subtyps B abgeleitet ist und/oder ein zusätzliches Antigen, das aus dem Epitopbereich I von gp41 des HIV1-Subtyps B abgeleitet ist, eingesetzt. Ein solches Antigengemisch verbessert die HIV1-Subtypen-Erkennung der Gruppe M nochmals erheblich.

Ebenfalls bevorzugt wird zu den oben beschriebenen Antigengemischen ein weiteres zusätzliches Antigen, das aus dem Epitopbereich II von gp41 eines HIV1-Subtyp O-Isolats abgeleitet ist und/oder ein zusätzliches Antigen, das aus dem Epitopbereich I von gp41 eines HIV1-Subtyp O-Isolats abgeleitet ist, eingesetzt. Ein solches Antigengemisch verbessert nochmals die HIV1-Subtypen-Erkennung, da somit sowohl die Erkennung von Gruppe M-Subtypen als auch von Subtyp O in einem Ansatz sichergestellt werden kann. Beispielhaft und bevorzugt können hier folgende Mischungen genannt werden, die sich als vorteilhaft bei der Bestimmung von HIV-Subtypen herausgestellt haben:

---

Mischung von Antigenen aus dem Epitopbereich II von gp41:

Subtyp B:            L G I W G C S G K L I C T T A V

Subtyp D:            L G I W G C S G K H I C T T I V

Subtyp O (Ant 70): L S L W G C K G K L V C Y T S V

Mischung von Antigenen aus dem Epitopbereich I von gp41:

Subtyp E:            A V E R Y L K D Q K F L G L W

Subtyp B:            A V E R Y L K D Q Q L L G I W

Subtyp O (Ant 70): A L E T L L Q N Q Q L L S L W

Selbstverständlich können auch zusätzliche Antigene dieses Bereiches eingesetzt werden, die weitere HIV-Subtypen wie zum Beispiel Subtyp A, C, F oder G erkennen. Einzige Voraussetzung ist, daß der Testablauf an sich noch funktionieren muß. Sollten sich

zukünftig weitere HIV-Subtypen identifizieren lassen, ist es für den Fachmann selbstverständlich, weitere Antigene einzusetzen, die dann vom env-Bereich des jeweiligen Subtyps und bevorzugt vom gp41-Bereich abgeleitet sind.

Die genannten erfindungsgemäßen Antigene und Antigengemische können selbstverständlich nach dem Fachmann geläufigen Methoden auch zur Herstellung von Antikörpern oder Vakzinen verwendet werden.

Die eingesetzten Antigene sind nicht auf solche Antigene beschränkt, die von HIV1-Subtypen abgeleitet sind. Um eine zuverlässige Erfassung von HIV-Infektionen unabhängig vom Virusstamm zu gewährleisten, ist es wünschenswert, zusätzlich zu den beschriebenen Antigenen des env-Bereiches von HIV1 auch Antigene einzusetzen, die vom env-Bereich und insbesondere von gp36 von HIV2 abgeleitet sind.

Die erfindungsgemäßen Antigene und Antigengemische sind - wie weiter oben bereits erläutert - von einem HIV1-Genprodukt des env-Bereiches, insbesondere vom gp41 und besonders bevorzugt aus dem Epitopbereich I und II des gp41 abgeleitet. Bevorzugt entspricht die Aminosäuresequenz der natürlich vorkommenden Sequenz, da somit sichergestellt werden kann, daß die verschiedenen Subtypen im immunologischen Nachweisverfahren sicher detektiert werden. Das heißt, daß die in der Probe enthaltenen Antikörper, die gegen einen bestimmten HIV1-Subtyp gerichtet sind, diese Antigene spezifisch binden. Im Falle des Brückentests müßten die Antigene durch den Antikörper verbrückt werden.

Unter dem Begriff „Antigen“ ist ein Bindepartner zu verstehen, der an einen Antikörper mit entsprechender Bindungsstelle spezifisch bindet. Das Antigen stellt das Epitop dar, das vom Antikörper erkannt und spezifisch gebunden wird. Das Antigen ist bevorzugt ein Peptid oder Protein, besteht also bevorzugt aus Aminosäuren, kann jedoch auch durch Zuckerstrukturen und/oder Lipidstrukturen modifiziert werden. Voraussetzung ist, daß die antigenen Eigenschaften des Antigens, das heißt die Bindefähigkeit mit dem nachzuweisenden Antikörper nicht wesentlich verändert wird. Die Antigene können



natürlich auch als reine Peptide ohne weitere Modifikationen eingesetzt werden. Der Einsatz unmodifizierter Antigene ist beispielsweise bei kompetitiven Tests denkbar. Prinzipiell sind alle für die jeweilige Testführung erforderlichen und dem Fachmann geläufigen Modifikationen der Antigene erlaubt. Wesentlich ist immer, daß die Bindefähigkeit der Antigene an die spezifisch nachzuweisenden Antikörper erhalten bleibt.

Werden peptidische Antigene eingesetzt, kann es durchaus vorteilhaft sein, die Peptide zu modifizieren. Das heißt, daß ein Peptid, das einen bestimmten Epitop-Bereich darstellt, beispielsweise außerdem N-terminal und/oder C-terminal flankierende Sequenzen besitzen kann, die nicht mehr dem spezifischen Epitop entsprechen. Das heißt, es können in den Peptiden auch epitopfremde Sequenzen enthalten sein, die natürlicherweise nicht in diesem Aminosäure-Zusammenhang vorkommen. Die einzige Voraussetzung ist, daß trotz der flankierenden Aminosäuren die Epitope des Peptids dennoch erhalten bleiben. Das bedeutet, daß die nachzuweisenden Antikörper das jeweilige Epitop spezifisch binden können. Des weiteren ist es möglich, das Peptid mit dem Fachmann geläufigen Spacer-Gruppen zu versehen. Die einzige Bedingung auch hier ist wiederum, daß die Bindefähigkeit an die zu bestimmenden Antikörper erhalten bleibt.

---

Die Peptide oder Antigene können auch innerhalb des Epitop-Bereiches modifiziert werden, beispielsweise durch Substitution, Deletion oder Insertion einzelner Aminosäurereste. Voraussetzung bei solchen Veränderungen ist allerdings immer, daß die spezifische Bindefähigkeit der nachzuweisenden Antikörper erhalten bleibt.

Unter den erfindungsgemäßen Peptiden und Antigenen, die einem spezifischen Epitop des env-Bereiches und insbesondere des Epitopbereichs I und II des gp41 entsprechen, sind auch Peptidderivate zu verstehen, in denen eine oder mehrere Aminosäuren durch eine chemische Reaktion derivatisiert worden sind. Beispiele von erfindungsgemäßen Peptidderivaten sind insbesondere solche Moleküle, in denen das Backbone oder/und reaktive Aminosäureseitengruppen, zum Beispiel freie Aminogruppen, freie Carboxylgruppen oder/und freie Hydroxylgruppen, derivatisiert worden sind. Spezifische Beispiele für Derivate von Aminogruppen sind Sulfonsäure- oder Carbonsäureamide, Thiourethanderivate und Ammoniumsalze, zum Beispiel Hydrochloride, Carboxylgruppen-

derivate sind Salze, Ester und Amide. Beispiele für Hydroxygruppenderivate sind O-Acyl- oder O-Alkylderivate. Die Herstellung der Peptide erfolgt bevorzugt durch chemische Synthese nach dem Fachmann bekannten Methoden und bedürfen hier keiner besonderen Erläuterung. Prinzipiell können die Peptide und Antigene auch mittels rekombinanter Methoden hergestellt werden. Dabei können die beanspruchten Epitope bzw. Antigene Teil eines größeren rekombinanten Proteins sein.

Weiterhin umfaßt der Begriff Peptidderivat auch solche Peptide, in denen eine oder mehrere Aminosäuren durch natürlich vorkommende oder nicht-natürlich vorkommende Aminosäurehomologe der 20 „Standard“-Aminosäuren ersetzt werden. Beispiele für solche Homologe sind 4-Hydroxyprolin, 5-Hydroxylysin, 3-Methylhistidin, Homoserin, Ornithin,  $\beta$ -Alanin und 4-Aminobuttersäure. Die Peptidderivate müssen eine im wesentlichen äquivalente Spezifität oder/und Affinität der Bindung an die zu bestimmenden Antikörper aufweisen, wie die Peptide oder Antigene, aus denen sie abgeleitet sind.

Als erfindungsgemäße Peptide oder Antigene, die einem spezifischen Epitop entsprechen, werden auch peptidmimetische Substanzen, im folgenden Peptidmimetika genannt,

---

verstanden, die eine im wesentlichen äquivalente Spezifität oder/und Affinität der Bindung an die zu bestimmenden Antikörper aufweisen, wie die zuvor genannten Peptide oder Peptidderivate. Peptidmimetika sind Verbindungen, die Peptide in ihrer Wechselwirkung mit dem zu bestimmenden Antikörper ersetzen können und gegenüber den nativen Peptiden eine erhöhte Stabilität, insbesondere gegenüber Proteinasen oder Peptidasen, aufweisen können. Methoden zur Herstellung von Peptidmimetika sind beschrieben bei Giannis und Kolter, Angew. Chem. 105 (1993), 1303-1326 und Lee et al., Bull. Chem. Soc. Jpn. 66 (1993), 2006-2010.

Die Länge eines Epitops, d.h. somit auch die Länge der erfindungsgemäßen Antigene, orientiert sich an den natürlicherweise vorkommenden Epitopen des gp41. Die Mindestlänge eines Epitops beträgt üblicherweise mindestens 4 bis 6 Aminosäuren. Bevorzugt liegt die Länge jedoch darüber, das heißt zwischen 6 und 20, und besonders bevorzugt zwischen 8 bis 15 Aminosäuren. Im Falle der Peptidmimetika oder Peptidderivate ist eine analoge Länge beziehungsweise Größe des Moleküls notwendig.

Die erfindungsgemäßen Antigene können für den Einsatz in Immunoassays mit FestphasenBindegruppen wie Biotin und Haptenen wie Digoxigenin und anderen Markierungsgruppen wie beispielsweise Metallchelate-Komplexen nach dem Fachmann bekannten Verfahren versehen werden. Verfahren zur Herstellung von haptemarkierten Peptiden sind beispielsweise in der WO 96/03423 beschrieben. Verfahren zur Herstellung von metallchelatmarkierten Peptiden sind in der WO 96/03651 erläutert.

Die Antigene können nicht nur einzeln oder als Gemisch einzelner Antigene eingesetzt werden, wobei jedes Antigen ein Epitop nur einmal enthält. Oftmals kann es auch von Vorteil sein, wenn Epitope mehrfach, also als multiple Epitope vorhanden sind. Ein solches multiples Epitop wird auch als Polyhaptene bezeichnet. Polyhaptene sind insbesondere zum Nachweis von spezifischem IgM geeignet. In der WO 96/03652 werden solche Polyhaptene und Verfahren zu deren Herstellung offenbart. Auch die Kopplung solcher Polyhaptene mit Markierungsgruppen, Haptenen und Festphasen-Bindegruppen ist dort offenbart. Bevorzugt werden die erfindungsgemäßen Antigene als Polyhaptene eingesetzt, deren Herstellungsverfahren der Fachmann leicht aus der WO 96/03652 entnehmen kann.

---

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Reagenz zum Nachweis von Antikörpern gegen HIV mittels eines Immunoassays bestehend aus

- a) mindestens einem Antigen von gp41 eines HIV1-Subtyp D-Isolats, bevorzugt abgeleitet aus dem Epitopbereich II (AS 518-533) der Consensus D-Sequenz und mindestens einem Antigen, das aus dem entsprechenden Bereich von gp41 eines anderen HIV1-Subtyp-Isolats der Gruppe M abgeleitet ist, und/oder
- b) mindestens einem Antigen von gp41 eines HIV1-Subtyp E-Isolats, bevorzugt abgeleitet aus dem Epitopbereich I (AS 551-565) der Consensus E-Sequenz und mindestens einem Antigen, das aus dem entsprechenden Bereich von gp41 eines anderen HIV1-Subtyps der Gruppe M abgeleitet ist, und den üblichen Testzusätzen für Immunoassays. Zu den übliche Testzusätzen zählen beispielsweise Puffer, Salze, Detergenzien, und Hilfsstoffe wie

Rinderserumalbumin. Die notwendigen Zusätze sind dem Fachmann bekannt oder können von ihm auf einfache Weise herausgerunden werden.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung weiter.

---

## Beispiele

### Beispiel 1: Synthese der biotinylierten Peptide

Die entsprechenden Teilsequenzen der Aminosäuresequenz des HIV-gp41-Virusproteins werden mittels Fluorenylmethyloxycarbonyl-(Fmoc)-Festphasenpeptidsynthese an einem Batch-Peptidsynthesizer, z.B. von Applied Biosystems A431 oder A433, hergestellt. Dazu werden jeweils 4.0 Äquivalente von folgenden Fmoc-Aminosäurederivaten verwendet:

Tabelle 5:

A	Fmoc-Ala-OH
C	Fmoc-Cys(Trt)-OH
D	Fmoc-Asp(tBu)-OH
E	Fmoc-Glu(tBu)-OH
F	Fmoc-Phe-OH
G	Fmoc-Gly-OH
H	Fmoc-His(Trt)-OH
I	Fmoc-Ile-OH
K	Fmoc-Lys(Phenylacetyl)-OH
L	Fmoc-Leu-OH
M	Fmoc-Met-OH
N	Fmoc-Asn(Trt)-OH
P	Fmoc-Pro-OH
Q	Fmoc-Gln(Trt)-OH
R	Fmoc-Arg(Pmc)-OH
S	Fmoc-Ser(tBu)-OH
T	Fmoc-Thr(tBu)-OH
U	Fmoc-βAlanin
V	Fmoc-Val-OH
W	Fmoc-Trp-OH
X	Boc-Lys(Fmoc)-OH
Y	Fmoc-Tyr(tBu)-OH
Z	Fmoc-Aminocapronsäure

Die Aminosäuren oder Aminosäurederivate werden in N-Methylpyrrolidon gelöst. Das Peptid wird an 400-500 mg 4-(2',4'-Dimethoxyphenyl-Fmoc-Aminomethyl)-Phenoxy-

Harz (Tetrahedron Letters 28 (1987), 2107) mit einer Beladung von 0.4 - 0.7 mmol/g aufgebaut (JACS 95 (1973), 1328). Die Kupplungsreaktionen werden bezüglich Fmoc-Aminosäurederivat mit 4 Äquivalenten Dicyclohexylcarbodiimid und 4 Äquivalenten N-Hydroxybenzotriazol in Dimethylformamid als Reaktionsmedium während 20 min durchgeführt. Nach jedem Syntheseschritt wird die Fmoc-Gruppe mit 20 %igem Piperidin in Dimethylformamid in 20 min abgespalten. Enthalten die Peptide eine intramolekulare Disulfidbrücke, so wird die Fmoc-geschützte, Peptidsequenz vor der Kupplung des artifiziellen Spacers mit Jod in Hexafluorisopropanol/Dichlormethan (Kober et al., The Peptide Academic Press, New York, 1981, pp 145-47) an der Festphase oxidiert und anschließend die N-terminale Fmoc-Schutzgruppe abgespalten, und der Spacer sowie das N-terminale Biotin oder ein Bispyridyl-Ruthenium-Komplex gekuppelt.

Die Freisetzung des Peptides vom Syntheseharz und die Abspaltung der säurelabilen Schutzgruppen - mit Ausnahme der Phenylacetylenschutzgruppe am Lysin - erfolgt mit 20 ml Trifluoressigsäure, 0.5 ml Ethandithiol, 1 ml Thioanisol, 1.5 g Phenol und 1 ml Wasser in 40 min bei Raumtemperatur. Die Reaktionslösung wird anschließend mit 300 ml ~~gekühltem Diisopropylether versetzt und zur vollständigen Fällung des Peptides 40 min bei~~ 0°C gehalten. Der Niederschlag wird abfiltriert, mit Diisopropylether nachgewaschen, mit wenig 50 %iger Essigsäure gelöst und lyophilisiert. Das erhaltene Rohmaterial wird mittels präparativer HPLC an Delta-PAK RP C18-Material (Säule 50 x 300 mm, 100 Å, 15 µ) über einen entsprechenden Gradienten (Eluent A: Wasser, 0.1 % Trifluoressigsäure, Eluent B: Acetonitril, 0.1 % Trifluoressigsäure) in ca 120 min aufgereinigt. Die Identität des eluierten Materials wird mittels Ionenspray-Massenspektrometrie geprüft.

**Tabelle 6: Synthetisierte biotinylierte Peptide:**

Consensus B	Antigen 1	Biotin	XUZU	L	G	I	W	G	C (ox)	S	G	K	L	I	C (ox)	T	T	A	V
Consensus D	Antigen 2	Biotin	XUZU	L	G	I	W	G	C (ox)	S	G	K	H	I	C (ox)	T	T	I	V

Die Bezeichnung „C (ox)“ steht für eine intramolekulare Disulfidbrücke. „XUZU“ ist der Spacer (s. Tabelle 5).

**Beispiel 2: Synthese der digoxigenylierten Peptide**

Die Peptidsynthese erfolgt analog zu Beispiel 1. Befinden sich Lysine in der Sequenz, wird zur Synthese das Aminosäurederivat Fmoc-Lys(PhAc)-OH anstatt Fmoc-Lys(Boc)-OH eingesetzt. Die Synthese wird nach der Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe der letzten Spacer-Aminosäure beendet. Bei der Freisetzung des Peptides vom Synthescharz und der Abspaltung der säurelabilen Schutzgruppen wird die Phenylacetylenschutzgruppe am Lysin nicht entfernt.

Die Einführung des Digoxigenin- bzw. Digoxin-Labels erfolgt über Aktivester-Derivate (beispielsweise Digoxigenin-3-carboxymethylether-N-hydroxysuccinimidester) an die freien Aminogruppen des Peptids in Lösung. Das zu derivatisierende Peptid wird in einer Mischung aus DMSO und 0.1 M Kaliumphosphat-Puffer pH 8.5 gelöst. Anschließend werden 2 Äquivalente Aktivester pro freie primäre Aminofunktion in wenig DMSO gelöst zugetropft und bei Raumtemperatur gerührt. Der Umsatz wird über analytische HPLC verfolgt. Das Produkt wird mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

Enthält das Peptid noch mit Phenylacetyl-geschützte Lysine, so wird diese Schutzgruppe im letzten Schritt enzymatisch mit immobilisierter PenG-Amidase in wässrigem Milieu mit organischem Solvens-Anteil bei Raumtemperatur abgespalten. Das immobilisierte Enzym wird abfiltriert und das Peptid über präparative HPLC aufgereinigt. Die Identität des eluierten Materials wird mittels Ionenspray-Massenspektrometrie geprüft.

**Tabelle 7: digoxigenylierte Peptide**

Consensus B	Antigen 3	Dig-3-cme-	UZU	L	G	I	W	G	C (ox)	S	G	K	L	I	C (ox)	T	T	A	V
Consensus D	Antigen 4	Dig-3-cme-	UZU	L	G	I	W	G	C (ox)	S	G	K	H	I	C (ox)	T	T	I	V

### Beispiel 3: Bewertung der subtypenspezifischen Antigene

#### 3.1. Immunologischer Test allgemein

Die Versuchsdurchführung erfolgte analog zu der in der Packungsbeilage des Enzymun-Test<sup>®</sup> Anti-HIV 1+2+SubtypO (Best.Nr. 1557319, Boehringer Mannheim GmbH, Deutschland) beschriebenen Vorgehensweise. Lediglich die Antigenflaschen 2a und 2b wurden gegen eine Peptid-Lösung (Einsatzmenge Antigen jeweils 5 nmol/ml) ausgetauscht. Alle Puffer und Detektionsreagentien wurden beibehalten. Der Test wurde bei 25°C auf dem Gerät ES 600 oder ES700 (Hersteller: Boehringer Mannheim GmbH, Deutschland) in einem Probenvolumen von 100 µl in streptavidinbeschichteten Teströhrchen nach dem Prinzip des 2-Schritt-Sandwich-ELISA durchgeführt. Im einzelnen wurden folgende Reagenzien verwendet:

- Inkubationspuffer: Tris 50 mM pH 7.5; Rinderserumbestandteile
  - Konjugatpuffer: Tris 50 mM pH 7.5; Rinderserumbestandteile
  - Konjugat: Peroxidase(POD)-markierte Anti-Digoxigenin-Antikörper vom Schaf
  - Substrat: ABTS<sup>®</sup>-Substratlösung (2,2'-Azino-di[3-ethylbenzthiazolin-sulfonat] 1.9 mmol/l in 100 mmol/l Phosphat/Citrat-Puffer, pH 4.4, Natriumperborat 3.2 mmol/l)
-



## 3.2. Ergebnisse der Bewertung

Flasche 2a		Antigen 1 (Subtyp B)	Antigen 2 (Subtyp D)	Antigen 1 + 2 (Subtyp B+D)
Flasche 2b		Antigen 3 (Subtyp B)	Antigen 4 (Subtyp D)	Antigen 3 + 4 (Subtyp B+D)
<b>Serum</b>	<b>Subtyp</b>			
<b>Negativkontrolle</b>	alle Signale in E	0.05	0.03	0.05
<b>Serum 1</b>	<b>B</b>	<b>4.49</b>	<b>4.10</b>	<b>4.55</b>
Serum 1 Verdünnung 1:10		4.10	3.24	4.32
Serum 1 Verdünnung 1:100		2.78	0.56	3.06
Serum 1 Verdünnung 1:1000		2.10	0.15	2.28
Serum 1 Verdünnung 1:10000		0.69	0.05	0.74
Serum 1 Verdünnung 1:100000		0.17	0.03	0.18
Serum 1 Verdünnung 1:1000000		0.05	0.01	0.05
<b>Serum 2</b>	<b>D</b>	<b>3.45</b>	<b>4.75</b>	<b>4.82</b>
Serum 2 Verdünnung 1:10		2.71	4.24	3.97
Serum 2 Verdünnung 1:100		2.19	3.98	2.94
Serum 2 Verdünnung 1:1000		1.49	2.55	2.63
Serum 2 Verdünnung 1:10000		0.37	1.04	0.77
Serum 2 Verdünnung 1:100000		0.16	0.20	0.29
Serum 2 Verdünnung 1:1000000		0.03	0.09	0.06
<b>Serum 3</b>	<b>B</b>	<b>3.07</b>	<b>2.58</b>	<b>3.08</b>
Serum 3 Verdünnung 1:10		2.39	0.35	2.46
Serum 3 Verdünnung 1:100		1.74	0.12	1.87
Serum 3 Verdünnung 1:1000		0.58	0.08	0.69
Serum 3 Verdünnung 1:10000		0.16	0.05	0.20
Serum 3 Verdünnung 1:100000		0.04	0.04	0.05
Serum 3 Verdünnung 1:1000000		0.00	0.02	0.00
<b>Serum 4</b>	<b>B</b>	<b>5.08</b>	<b>4.99</b>	<b>4.67</b>
Serum 4 Verdünnung 1:10		4.68	4.72	4.89

Serum 4 Verdünnung 1:100		2.89	2.86	3.35
Serum 4 Verdünnung 1:1000		3.04	0.85	3.07
Serum 4 Verdünnung 1:10000		1.29	0.15	1.38
Serum 4 Verdünnung 1:100000		0.62	0.05	0.69
Serum 4 Verdünnung 1:1000000		0.40	0.00	0.46

Der Einsatz der Antigenmischung mit Antigenen verschiedener HIV-Subtypen erweist sich als vorteilhaft gegenüber dem Einsatz der einzelnen Antigene: Der Einsatz der Antigenmischung führt zu deutlich früherer Erkennung (bei höherer Verdünnung) von infizierten Proben, d.h. durch die Verwendung der Antigenmischung wird die Verdünnungssensitivität positiv beeinflusst. Mit den erfindungsgemäßen Antigenmischungen können Infektionen mit Subtyp B und Subtyp D zuverlässiger detektiert werden. Subtyp B-Seren reagieren mit Subtyp B-spezifischen Antigenen in höheren Verdünnungen als mit Subtyp-D spezifischen Antigenen. Analog dazu reagieren Subtyp D-Seren mit Subtyp-D spezifischen Antigenen auch bei stärkerer Verdünnung der Seren positiv, während sie mit Subtyp B-spezifischen Antigenen schwächer reagieren.

---

**Patentansprüche**

1. Verfahren zum Nachweis von Antikörpern gegen HIV mittels eines Immunoassays dadurch gekennzeichnet, daß

a) mindestens ein Antigen von gp41 eines HIV1-Subtyp D-Isolats und mindestens ein Antigen, das von gp41 eines anderen HIV1-Subtyps der Gruppe M abgeleitet ist, verwendet wird und/oder

b) mindestens ein Antigen von gp41 eines HIV1-Subtyp E-Isolats und mindestens ein Antigen, das von gp41 eines anderen HIV1-Subtyps der Gruppe M abgeleitet ist, verwendet wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß

a) mindestens ein Antigen aus dem Epitopbereich II der Consensus-Sequenz eines HIV1-Subtyp D-Isolats und mindestens ein Antigen, das aus dem entsprechenden Bereich von gp41 eines anderen HIV1-Subtyps der Gruppe M abgeleitet ist, verwendet wird und/oder

b) mindestens ein Antigen aus dem Epitopbereich I der Consensus-Sequenz eines HIV1-Subtyp E-Isolats und mindestens ein Antigen, das aus dem entsprechenden Bereich von gp41 eines anderen HIV1-Subtyps der Gruppe M abgeleitet ist, verwendet wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß das Antigen von gp41 eines HIV1-Subtyp D-Isolats den SEQ ID NO 1 bis 11 oder Teilsequenzen davon entspricht, und/oder

das Antigen von gp41 eines HIV1-Subtyp E-Isolats der SEQ ID NO 12 oder Teilsequenzen davon entspricht.

4. Antigengemisch bestehend aus mindestens zwei Antigenen, wobei mindestens ein Antigen von gp41 eines HIV1-Subtyp D-Isolats und mindestens ein Antigen von gp41 eines anderen HIV1-Subtyps der Gruppe M abgeleitet ist und/oder

mindestens ein Antigen von gp41 eines HIV1-Subtyp E-Isolats und mindestens ein Antigen von gp41 eines anderen HIV1-Subtyps der Gruppe M abgeleitet ist.

5. Antigengemisch gemäß Anspruch 4 dadurch gekennzeichnet, daß das Antigen von gp41 eines HIV1-Subtyp D-Isolats aus dem Epitopbereich II der Consensus-Sequenz von HIV1-Subtyp D abgeleitet ist.

und/oder

das Antigen von gp41 eines HIV1-Subtyp E-Isolats aus dem aus dem Epitopbereich I der Consensus-Sequenz von HIV1-Subtyp E abgeleitet ist.

6. Antigengemisch gemäß Anspruch 4 oder 5 dadurch gekennzeichnet, daß das Antigen von gp41 eines HIV1-Subtyp D-Isolats den SEQ ID NO 1 bis 11 oder Teilsequenzen davon mit einer Mindestlänge von 7 AS entspricht.

und/oder

das Antigen von gp41 eines des HIV1-Subtyp E-Isolats der SEQ ID NO 12 oder Teilsequenzen davon mit einer Mindestlänge von 6 AS entspricht.

7. Antigengemisch gemäß einem der Ansprüche 4 bis 6 dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich ein Antigen eingesetzt wird, das aus dem Epitopbereich I und/oder II von HIV1-Subtyp O abgeleitet ist.

---

8. Antigen, das eine Sequenz gemäß SEQ ID NO 1 bis 11 oder Teilsequenzen davon mit einer Mindestlänge von 7 Aminosäuren enthält.

9. Antigen, das eine Sequenz gemäß SEQ ID NO 12 oder Teilsequenzen davon mit einer Mindestlänge von 6 Aminosäuren enthält.

10. Verwendung eines Antigengemisches gemäß einem der Ansprüche 5 bis 7 zum Nachweis von Antikörpern gegen HIV.

11. Verwendung eines Antigens gemäß einem der Ansprüche 8 oder 9 zum Nachweis von Antikörpern gegen HIV.

12. Verwendung eines Antigens gemäß Anspruch 8 oder 9 oder eines Antigengemisches, gemäß einem der Ansprüche 5 bis 7 in einem Kombitest gemäß DE 197 09 762.6 zum Nachweis von Antikörpern gegen HIV.

13. Reagenz zum Nachweis von Antikörpern gegen HIV mittels eines Immunoassays bestehend aus

- a) mindestens einem Antigen von gp41 eines HIV1-Subtyp D-Isolats und mindestens einem Antigen, das von gp41 eines anderen HIV1-Subtyps der Gruppe M abgeleitet ist, und/oder
- b) mindestens einem Antigen von gp41 eines HIV1-Subtyp E-Isolats und mindestens einem Antigen, das von gp41 eines anderen HIV1-Subtyps der Gruppe M abgeleitet ist, und den üblichen Testzusätzen für Immunoassays.

14. Reagenz zum Nachweis von Antikörpern gegen HIV mittels eines Immunoassays bestehend aus

- a) mindestens einem Antigen von gp41 eines HIV1-Subtyp D-Isolats aus dem Epitopbereich II der Consensus-Sequenz von HIV1-Subtyp D und mindestens einem Antigen, das von gp41 eines anderen HIV1-Subtyps der Gruppe M abgeleitet ist, und/oder
- b) mindestens einem Antigen von gp41 eines HIV1-Subtyp E-Isolats aus dem Epitopbereich I der Consensus-Sequenz von HIV1-Subtyp E und mindestens einem Antigen, das von gp41 eines anderen HIV1-Subtyps der Gruppe M abgeleitet ist, und den üblichen Testzusätzen für Immunoassays.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/02816

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 6 C07K14/16 G01N33/569

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C07K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 468 441 A (PRENDERGAST) 29 January 1992 see claim 12	8.11
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 108, no. 3, 18 January 1988 Columbus, Ohio, US; abstract no. 20148, J W GNANN JR ET AL.: "Synthetic peptide immunoassay distinguishes HIV type 1 and HIV type 2 infections" XP002081157 & SCIENCE., vol. 237, no. 4820, 1987, pages 1346-1349, LANCASTER, PA US see the whole document	8.11
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

**Special categories of cited documents:**

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "3" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 October 1998

Date of mailing of the international search report

02/11/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Masturzo, P

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 93/02816

## C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 87 06005 A (ORTHO) 8 October 1987 see claim 1	3-12
A	FR 2 730 493 A (INSTITUT PASTEUR) 14 August 1996 see the whole document	1-12
A	WO 90 07119 A (IMMUNDIAGNOSTICS) 28 June 1990 see the whole document	3-12

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/02816

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 468441	A	29-01-1992	AP 255 A	05-05-1993
			AU 1345995 A	18-05-1995
			AU 8126891 A	30-01-1992
			CA 2047618 A	24-01-1992
			OA 9508 A	15-11-1992
WO 8706005	A	08-10-1987	AU 1130392 A	04-06-1992
			AU 7234387 A	20-10-1987
			AU 8172094 A	23-03-1995
			DE 3788397 D	20-01-1994
			DE 3788397 T	01-06-1994
			DK 614987 A	23-11-1987
			EP 0261224 A	30-03-1988
			JP 63502904 T	27-10-1988
FR 2730493	A	14-08-1996	NONE	
WO 9007119	A	28-06-1990	AT 135113 T	15-03-1996
			AU 641375 B	23-09-1993
			AU 4816690 A	10-07-1990
			CA 2005955 A	20-06-1990
			DE 68925909 D	11-04-1996
			DE 68925909 T	14-11-1996
			EP 0449955 A	09-10-1991
			JP 4502325 T	23-04-1992
			US 5260189 A	09-11-1993



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/02816

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 6 C07K14/16 G01N33/569

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07K G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
------------	--	--------------------

X	EP 0 468 441 A (PRENDERGAST) 29. Januar 1992 siehe Anspruch 12 ---	8.11
---	---	------

X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 108, no. 3. 18. Januar 1988 Columbus, Ohio, US; abstract no. 20148, J W GNANN JR ET AL.: "Synthetic peptide immunoassay distinguishes HIV type 1 and HIV type 2 infections" XP002081157 & SCIENCE... Bd. 237, Nr. 4820, 1987, Seiten 1346-1349. LANCASTER, PA US siehe das ganze Dokument ---	8.11
---	--	------

-/--

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindungsmäßiger Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindungsmäßiger Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

16. Oktober 1998

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

02/11/1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beizensteter

Masturzo, P

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/02816

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Bez. Anspruch Nr.
A	WO 87 06005 A (ORTHO) 8. Oktober 1987 siehe Anspruch 1 ---	8-12
A	FR 2 730 493 A (INSTITUT PASTEUR) 14. August 1996 siehe das ganze Dokument ---	1-12
A	WO 90 07119 A (IMMUNDIAGNOSTICS) 28. Juni 1990 siehe das ganze Dokument -----	8-12

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/02816

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglieder der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 468441 A	29-01-1992	AP 255 A AU 1345995 A AU 8126891 A CA 2047618 A OA 9508 A	05-05-1993 18-05-1995 30-01-1992 24-01-1992 15-11-1992
WO 8706005 A	08-10-1987	AU 1130392 A AU 7234387 A AU 8172094 A DE 3788397 D DE 3788397 T DK 614987 A EP 0261224 A JP 63502904 T	04-06-1992 20-10-1987 23-03-1995 20-01-1994 01-06-1994 23-11-1987 30-03-1988 27-10-1988
FR 2730493 A	14-08-1996	KEINE	
WO 9007119 A	28-06-1990	AT 135113 T AU 641375 B AU 4816690 A CA 2005955 A DE 68925909 D DE 68925909 T EP 0449955 A JP 4502325 T US 5260189 A	15-03-1996 23-09-1993 10-07-1990 20-06-1990 11-04-1996 14-11-1996 09-10-1991 23-04-1992 09-11-1993